

## **EFFECTO DEL PH Y CONCENTRACIÓN DE HARINA DE LÁMINA DE *Undaria pinnatifida* SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS Y ANTIOXIDANTES DE SISTEMAS ALIMENTICIOS MODELO**

M. L. Balquinta <sup>1</sup>, S. C. Andrés <sup>1</sup>, F. G. Dellatorre <sup>2,3</sup>, A. N. Califano<sup>1</sup>, G. Lorenzo<sup>1,4</sup>

*1 Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET-CICPBA-UNLP). Facultad de Ciencias exactas, UNLP, 47 y 116, La Plata (1900), Argentina*

*2 Grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura y Pesca (GIDTAP), Facultad Regional Chubut, UTN*

*3 Centro para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR-CONICET).*

*4 Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP.*

*E-mail: [balquintamlaura@gmail.com](mailto:balquintamlaura@gmail.com)*

### **RESUMEN**

Las macroalgas marinas son recursos naturales muy ricos en diversos compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, anticarcinogénicas. En particular, el alga parda *Undaria pinnatifida* es una de las especies más consumidas mundialmente. Se procesan principalmente sus láminas para producir “wakame”, producto que no forma parte de nuestra dieta habitual. El wakame es rico en alginatos (~40%), y por ello, un buen recurso para conferir cuerpo y características reológicas deseadas a distintas matrices alimentarias tradicionales. Sin embargo, las condiciones ambientales del alimento (en particular el pH) pueden alterar sus propiedades resultando en características indeseadas. El objetivo del trabajo fue analizar el efecto del pH y la concentración de harina de lámina de *Undaria pinnatifida* (HA) sobre las características reológicas y funcionales de sistemas alimenticios modelo. Se utilizó HA obtenida por deshidratación y molienda a partir de láminas cosechadas en la costa de Puerto Madryn en abril-mayo 2018. Se determinó la granulometría de la HA y su composición: humedad (método indirecto), cenizas (calcinación a 550°C), proteínas (Kjeldahl), grasa (Soxhlet) y fibra dietaria total (kit enzimático). Se elaboraron suspensiones acuosas de HA a distintos pH (2,5-7,5) y concentraciones (5-9%) empleando un Diseño Central Compuesto, con nueve combinaciones, triplicando el punto central. Se realizaron ensayos reológicos de barrido de esfuerzo y de frecuencias para determinar la evolución de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), y ensayos rotacionales para determinar su comportamiento de flujo. También se analizó el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante, así como su estabilidad determinando el volumen de líquido liberado por centrifugación.

La HA mostró una distribución tamaños monomodal con un  $D_{4,3} = 453 \mu\text{m}$ . Asimismo, presentó 9,4% de humedad, 29,4% de cenizas, 11,6% de proteínas, 41,8% de fibra dietaria total, 1,3% de lípidos y un 6,5% de hidratos de carbono (por diferencia).

Todas las suspensiones de HA se comportaron como fluidos pseudoplásticos, aumentando el índice de consistencia con el incremento en la concentración, independientemente del pH. Asimismo, todas las suspensiones mostraron un comportamiento típico de sólidos viscoelásticos ( $G' > G''$ ) con una leve dependencia de ambos módulos con la frecuencia, que fue disminuyendo con la concentración de harina de alga en suspensión. Los barridos de esfuerzo mostraron que a medida que disminuía el pH, mayor fue  $G'$  y menor el esfuerzo de cruce entre ambos módulos. Esto podría deberse a que a bajos pH, los grupos  $\text{COO}^-$  del alginato estarían completamente protonados, la extensión de los enlaces de hidrógeno se incrementaría y, en consecuencia, aumentaría  $G'$ .

La estabilidad de las suspensiones disminuyó a pH bajos, posiblemente por la baja solubilidad del alginato en medio ácido, provocando la precipitación del mismo, formando aglomerados. En cuanto a la capacidad antioxidante y cantidad de polifenoles totales no se encontraron diferencias significativas entre los distintos puntos del diseño, presentando valores de 12,45  $\mu\text{moles Trolox/g HA}$  y 4,37 mg Ácido Gálico/g HA, respectivamente. Esto demostró la potencialidad de incorporar harina de *Undaria pinnatifida* a matrices alimentarias para conferir diferentes características reológicas, sin alterar las propiedades antioxidantes que aporta la HA aún en condiciones.

**Palabras claves:** macroalgas marinas, componentes, reología, capacidad antioxidante

## 1. Introducción

Las algas marinas (macroalgas) son los principales productores primarios en ecosistemas costeros del Mar Argentino. Desde el punto de vista nutricional, son ricas en vitaminas, minerales, oligoelementos y proteínas, y poseen la capacidad de equilibrar el organismo al actuar como estimulantes del metabolismo, incrementando la actividad de las glándulas endocrinas, circulación sanguínea, intercambios de minerales y eliminación de toxinas (Mohy El-Din & El-Ahwany, 2016). En particular, la macroalga parda *Undaria pinnatifida*, originaria de las costas de Japón, sur de China y Corea, es una de las cinco especies de algas marinas invasoras más peligrosas debido a su impacto ecológico y económico (Nyberg & Wallentinus, 2005). A raíz de introducciones accidentales o voluntarias, en la actualidad se encuentra ampliamente distribuida en las costas de Europa, Nueva Zelanda y Australia (Zenetos y col., 2005; Russell y col., 2008). En Argentina, *U. pinnatifida* se introdujo en 1992 en el Golfo Nuevo y está expandiéndose rápidamente a diversas localidades de la costa patagónica, probablemente produciendo daños ecológicos a la diversidad de la flora nativa (Casas y col., 2004). En el año 2008, el gobierno de la Provincia del Chubut declaró el estado de Emergencia Ambiental en el golfo San José por la invasión del alga *Undaria pinnatifida* (Decreto 1071/08). A partir

de esto, fue calificada por la Secretaría de Pesca de la provincia como recurso factible de ser cosechado en forma artesanal. La aplicación de este criterio implicaría un beneficio socio-económico, en particular para la comunidad de pescadores artesanales, para quienes podrían generarse nuevas fuentes de trabajo, asimismo, redundaría además en un beneficio ambiental por contribuir a la conservación de la biodiversidad autóctona, mediante el control de una especie invasora (Casas y col., 2004).

El producto comercial elaborado en Japón con la lámina de *Undaria* se denomina "Wakame". Dado que los hábitos de consumo en nuestro país no abarcan a este recurso como parte de la dieta, una posible vía para su incorporación sería la reformulación de matrices alimentarias tradicionalmente consumidas. El Wakame es rico en alginatos (~40%), y por ello, un buen recurso para conferir cuerpo y características reológicas deseadas a distintas matrices.

Siendo la utilización en dieta humana un destino de la biomasa cosechada, se evidencia la necesidad de conocer su aptitud para el mismo, ya que las condiciones ambientales del alimento (en particular el pH) pueden alterar sus propiedades resultando en características indeseadas. En ese marco, el objetivo del trabajo fue analizar el efecto del pH y la concentración de harina de lámina de *Undaria pinnatifida* (HA) sobre las características reológicas y antioxidantes de sistemas alimenticios modelo.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Obtención de harina de algas**

La harina de algas (HA) se obtuvo por deshidratación y molienda de láminas del alga parda *Undaria pinnatifida* cosechadas en la costa de Puerto Madryn entre abril-mayo 2018.

### **2.2 Composición proximal de la harina obtenida**

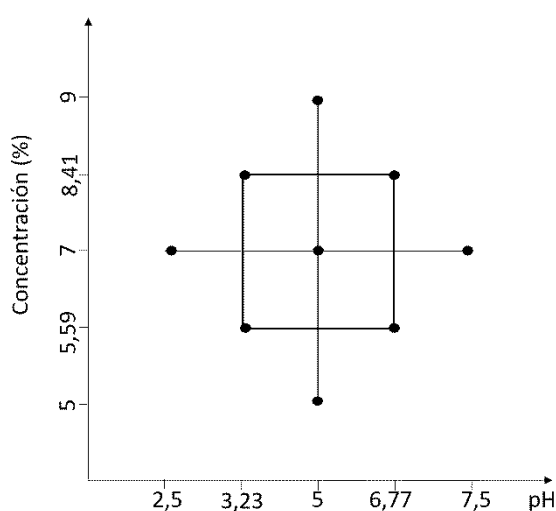
Se emplearon métodos AOAC (1984): la humedad se evaluó mediante el método indirecto (24.002), el contenido de cenizas totales por calcinación en mufla (24.009), el porcentaje de proteínas con el método de Kjeldahl-Arnold-Gunning (24.027) en equipo digestor y destilador Büchi 320 (Suiza), y el contenido de lípidos mediante una extracción semi continua con éter de petróleo (Soxhlet, 24005).

La fibra dietaria total se evaluó mediante un ensayo basado en el método 32-05.01 de la AACC y el método 985.29 de la AOAC (1990) usando el kit enzimático Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, County Wicklow, Irlanda).

### **2.3 Caracterización de suspensiones de harina de algas**

Se elaboraron suspensiones acuosas modelo de harina de lámina de *Undaria pinnatifida* en diferentes condiciones mediante dispersión en agua destilada haciendo uso de un agitador magnético. El pH de las suspensiones se ajustó con soluciones diluidas de HCl y NaOH. Las suspensiones se dejaron bajo agitación toda la noche controlando la historia térmica para evitar un sobrecalentamiento de las mismas por encima de los 35°C.

El estudio se realizó utilizando un Diseño Central Compuesto con nueve combinaciones, triplicando el punto central cuyas variables independientes fueron el pH de la suspensión (2,5 - 7,5) y la concentración de HA (5% - 9%), como se muestra en el esquema de la Figura 1.



**Figura 1.** Esquema del Diseño Central Compuesto.

Sobre cada uno de los puntos del diseño se realizaron:

**Determinación del contenido de polifenoles totales:** empleando el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteau. La absorbancia del color azul desarrollado se midió a 725 nm y los resultados se expresan en mg de ácido gálico por g de HA. Aunque existen estudios que comparan la cantidad de polifenoles según el solvente de extracción que se utilice, en éste trabajo solo se determinó sobre extractos etanólicos de HA, ya que los extractos acuosos adquirirían un aspecto muy viscoso, que dificultó los pasos posteriores a la extracción.

**Capacidad antioxidante:** se determinó sobre extractos etanólicos de HA empleando dos métodos: el método de DPPH<sup>•</sup> y el método de ABTS<sup>•+</sup>. En ambos casos, los resultados obtenidos se expresan en equivalente a Trolox (μmoles Trolox/g HA), un antioxidante sintético de referencia que se ensaya en las mismas condiciones.

**Ensayos reológicos:** en un reómetro de esfuerzo controlado Haake RS600 (Haake, Alemania) utilizando una geometría de platos paralelos de 60 mm de diámetro. Se realizaron ensayos rotacionales en estado estacionario barriendo velocidades de deformación entre  $5 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  para determinar la evolución de la viscosidad aparente de las suspensiones. Por otra parte, se realizaron ensayos oscilatorios de barridos de esfuerzos para determinar el rango viscoelástico lineal (RVL) y de frecuencia (dentro del RVL) para estudiar la evolución de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) de cada formulación. Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura controlada de 25 °C y se realizaron las determinaciones al menos por triplicado para cada muestra.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Composición porcentual

Los resultados obtenidos para la composición proximal de la harina de lámina de *Undaria pinnatifida* se presentan en la Tabla 1, destacándose su bajo contenido lipídico pero elevado contenido en fibra dietaria total, cenizas y proteínas, que coinciden con lo reportado en bibliografía.

Las algas marinas poseen un elevado contenido mineral (8 – 40 % del peso seco) en comparación con los vegetales terrestres, lo que coloca a las algas como una importante fuente de minerales. Han sido utilizadas también como fuente de proteínas por varias décadas, especialmente en países desarrollados. Su contenido proteico se ve influenciado por diversos factores y puede variar mucho entre los grandes grupos, e incluso entre partes del alga analizada, siendo en algas pardas generalmente bajo (5 – 24% del peso seco), excepto el Wakame (fracción de lámina de *Undaria pinnatifida*) que suele contener niveles mayores (Kumar y col., 2015).

Asimismo, son consideradas como importante fuente de fibra y para Wakame se han reportado niveles de  $38,8 \pm 0,5 \%$  (base seca) (Palasí, 2015), algo inferior a lo obtenido en este trabajo.

**Tabla 1.** Composición proximal de la harina de lámina de *Undaria pinnatifida*.

Componente	g/100g
------------	--------

Humedad	9,4 (0,05)
Cenizas	29,4 (0,05)
Proteínas	11,6 (0,10)
Fibra dietaria total	41,8 (0,84)
Lípidos	1,27 (0,02)
Hidratos de carbono	6,53* (1,06)

\* Este valor se determinó por diferencia

### 3.2 Polifenoles totales y capacidad antioxidante

Las algas marinas son consideradas una buena fuente de polifenoles ya que pueden presentar en su composición cantidades apreciables de estos compuestos, y que además han demostrado poseer actividades biológicas importantes tales como propiedades antioxidantes, antiproliferativas, antibióticas, antidiabéticas, antiVIH, antialérgicas y antiinflamatorias (Li y col., 2011).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos varía en función del grupo de compuesto estudiado y de su solubilidad en diferentes solventes así como por el método de análisis. Por ello, se suele utilizar más de un método a la hora de evaluar la capacidad antioxidante in vitro de un alimento o de un compuesto.

En éste trabajo, el contenido de polifenoles determinado sobre extractos etanólicos de la harina resultó de 4,37 (0,17) mg Ácido Gálico/g HA, no encontrándose diferencias significativas para los distintos puntos del diseño. Por otro lado, los valores medios obtenidos para la capacidad antioxidante sobre extractos etanólicos utilizando los métodos de ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup> fueron 13,53 (0,03) y 11,37 (0,11)  $\mu$ moles Trolox/g HA, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los distintos puntos del diseño. Muchos trabajos han informado de la alta correlación entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante determinada, atribuyendo a los polifenoles de las algas marinas, principalmente florotaninos en algas pardas como *Undaria* sp esta actividad (Wang y col., 2009).

### 3.3 Comportamiento de flujo

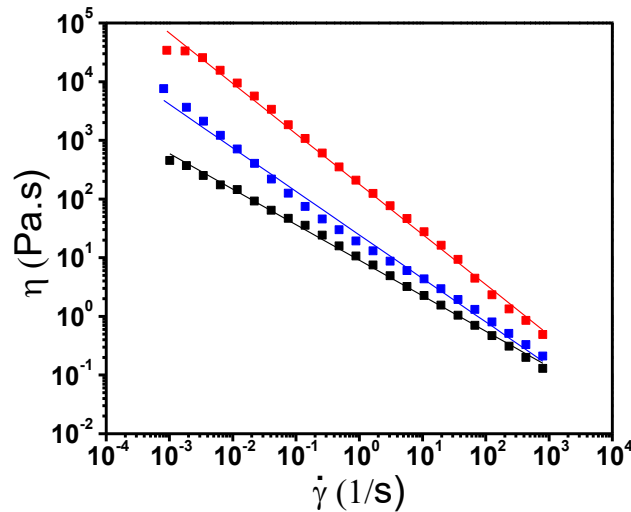
Todas las suspensiones de HA mostraron un comportamiento pseudoplástico en un amplio rango de velocidades de deformación ( $\dot{\gamma}$ ). Pese a que el ensayo fue realizado en condiciones de estado estacionario, en ningún momento pudo obtenerse un valor de viscosidad constante, lo que refleja una estructura débil y fácilmente deformable aun a

esfuerzos bajos. El comportamiento de los distintos sistemas pudo ser satisfactoriamente ajustado mediante la ley de la potencia:

$$\eta = K(\dot{\gamma})^{n-1} \quad (1)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad aparente de las suspensiones,  $K$  el índice de consistencia y  $n$  el índice de comportamiento de flujo.

En la Figura 2 se observan a modo de ejemplo, tres curvas de flujo correspondientes a las suspensiones de pH = 5. En todos los caso se detectó un marcado aumento del índice de consistencia con el incremento en la concentración (9,06, 24,5 y 180 Pa.s<sup>n</sup> para 5, 7 y 9% de HA, respectivamente). Asimismo, también se detectó un incremento en la pseudoplasticidad de las suspensiones, evidenciado por la disminución en el valor de  $n$  con el aumento en la concentración de harina de alga. Contrariamente, los cambios en el pH de las suspensiones no modificaron significativamente el comportamiento de flujo, independientemente de la concentración de HA.

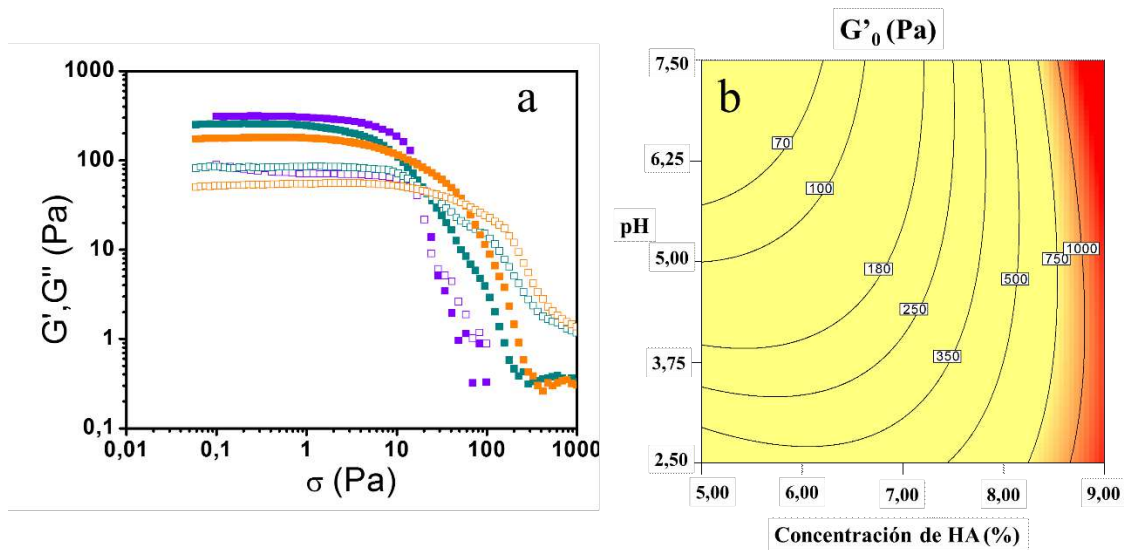


**Figura 2.** Curvas de flujo de una suspensión de harina de lámina de *Undaria pinnatifida* a pH = 5 y diferentes concentraciones (■ 5%; ■ 7%; ■ 9%).

### 3.4 Comportamiento viscoelástico

La Figura 3a muestra los barridos de esfuerzo de suspensiones acuosas con 7% de HA formuladas con distintos pH. Cualitativamente todas las suspensiones analizadas presentaron el mismo comportamiento, esto es, un comportamiento constante de ambos

módulos con el esfuerzo ( $G' = G'_0$  y  $G'' = G''_0$ ), hasta alcanzar un valor crítico de  $\sigma$ , donde la estructura sufre una abrupta ruptura. Al realizar un análisis de superficie de respuesta sobre los valores de  $G'_0$  se observó una marcada dependencia del valor del módulo elástico con la concentración de HA (Figura 3b). Este comportamiento es esperable ya que tanto la concentración de partículas insolubles como el incremento en la viscosidad debido a la presencia de alginato (principal hidrocoloide en lámina de *Undaria* sp) en la solución conducen a un sistema densamente empaquetado con mayores características sólidas.



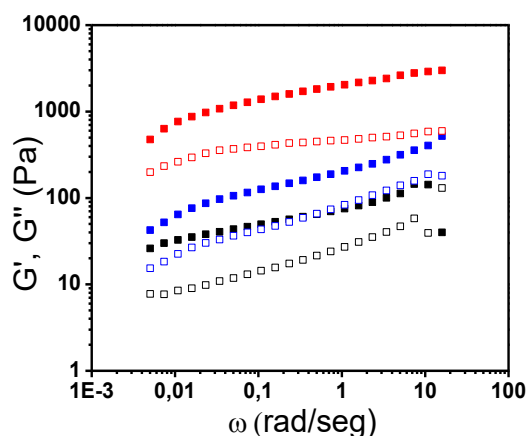
**Figura 3. a)** Barrido de esfuerzo de una suspensión de harina de lámina de *Undaria pinnatifida* 7% a distintos valores de pH (■ 2,5; ■ 5; ■ 7,5). Símbolos llenos: módulo elástico ( $G'$ ), símbolos vacíos: módulo viscoso ( $G''$ ). **b)** Superficie de respuesta del módulo elástico en el RVL ( $G'_0$ ) en función de la concentración y el pH de las suspensiones.

Por otra parte, los barridos de esfuerzo mostraron que a medida que disminuyó el pH, mayor fue  $G'_0$ , lo que pudo ser evidenciado principalmente cuando la concentración de HA fue baja (Figura 3b). Esto podría deberse a que a bajos pH, los grupos  $\text{COO}^-$  del alginato estarían completamente protonados, la extensión de los enlaces de hidrógeno se incrementaría y, en consecuencia, aumentaría  $G'$  y resultando menor el esfuerzo de cruce entre ambos módulos. A pH neutro la fracción molar del ácido algínico es muy pequeña, por lo cual la extensión de los enlaces de hidrógeno será menor en comparación con los hidrogeles ácidos, disminuyendo la proporción de enlaces cruzados intermoleculares efectivos en la red de hidrogel y, en consecuencia, se obtiene un valor menor de  $G'$ . En el rango básico, los grupos carboxilato estarían completamente disociados, mejorando la



repulsión entre ellos y, por lo tanto, desestabilizando la red polimérica y disminuyendo el valor de  $G'$  (Figura 3a) (Jabeen y col., 2016).

Asimismo, todas las suspensiones mostraron un comportamiento típico de sólidos viscoelásticos ( $G' > G''$ ) con una leve dependencia de ambos módulos con la frecuencia, que fue disminuyendo con la concentración de HA en suspensión (Figura 4).



**Figura 4.** Barrido de frecuencia de una suspensión de harina de lámina de *Undaria pinnatifida* a pH 5 y diferentes concentraciones (■ 5%; ■ 7%; ■ 9%).

#### 4. Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron la potencialidad de incorporar harina de lámina de *Undaria pinnatifida* a matrices alimentarias con diferentes valores de pH para conferir diferentes características reológicas sin que se vean alteradas sus propiedades antioxidantes.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET, Argentina), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina), Universidad Nacional de La Plata, Omega Sur S.A., y Milkaut S.A. En memoria de la Dra Alicia N. Califano (1951-2019), investigadora (CIDCA-CONICET, Argentina) altamente respetada y compañera a quien extrañamos profundamente.

#### Referencias

- Casas G.N., Scrosati R. & Piriz M.L. (2004). The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) reduces native seaweed diversity in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Biological Invasions* 6, 411–416.
- Jabeen, S., Maswal, M., Chat, O. A., Rather, G. M., & Dar, A. A. (2016). Rheological behavior and Ibuprofen delivery applications of pH responsive composite alginate hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 139, 211-218.

- Kumar, S., Sahoo, D., Levine, I. (2015). Assessment of nutritional value in a brown seaweed *Sargassum wightii* and their seasonal variations. *Algal Research*, 9, 117-125.
- Li, Y.X., Wijesekara, I., Li, Y., & Kim, S.K., 2011. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem.* 46 (12), 2219–2224.
- Mohy El-Din, S. M., & El-Ahwany, A. M. (2016). Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*). *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 471-484.
- Nyberg C.D. & Wallentinus I. (2005) Can species traits be used to predict marine macroalgal introductions? *Biological Invasions* 7, 265–279
- Palasí Mascaros, J. C. (2015). Trabajo Final de Grado. Caracterización físico – química y nutricional de algas en polvo empleadas como ingrediente alimentario. Escuela Técnica superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Valencia.
- Russell L.K., Hepburn C.D., Hurd C.L. & Stuart M.D. (2008). The expanding range of *Undaria pinnatifida* in southern New Zealand: distribution, dispersal mechanisms and the invasion of wave-exposed environments. *Biological Invasions* 10, 103–115.
- Wang, T., Jonsdottir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240–248.
- Zenetos, A., Çinar, M. E., Pancucci-Papadopoulou, M.A., Harmelin, J.G., Furnari, G., Andaloro, F., Bellou, N., Streftaris, N., & Zibrowius, H. (2005). Annotated list of marine alien species in the Mediterranean with records of the worst invasive species. *Mediterranean marine science*, 6(2), 63-118.